

## WO0163257

### Publication Title:

SPR sensor and SPR sensor array

### Abstract:

The invention relates to an SPR surface plasmon resonance spectroscopy sensor for parallel measurement of a plurality of samples, comprising a body (1a) having several SPR sensor areas (2) for guiding radiation in order to carry out SPR measurements and which are coated with a material which is suitable for SPR in such a way that each SPR sensor area (2) can be exclusively associated with a single sample. The radiation conducting body (1a) forms a unit with the SPR sensor areas (2), whereby the path of the rays guided by the SPR sensor areas (2) can also extend through the radiation conducting body (1a).

-----  
Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. August 2001 (30.08.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/63257 A1**

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 21/55**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/01793**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. Februar 2001 (16.02.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
100 08 006.5 22. Februar 2000 (22.02.2000) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **GRAFFINITY PHARMACEUTICAL DESIGN GMBH [DE/DE]**; Im Neuenheimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DICKOPF, Stefan [DE/DE]**; Ezanvillestrasse 4, 69118 Heidelberg (DE). **SCHMIDT, Kristina [DE/DE]**; Herrenwiesenstrasse 3/1, 69126 Heidelberg (DE). **VETTER, Dirk [DE/DE]**; Lutherstrasse 1, 69120 Heidelberg (DE).

(74) Anwälte: **KLUSMANN, Peter** usw.; Hoffmann. Eitle, Arabellastrasse 4, 81925 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

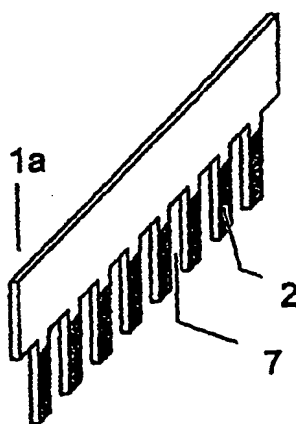
**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **SPR SENSOR AND SPR SENSOR ARRANGEMENT**

(54) Bezeichnung: **SPR-SENSOR UND SPR-SENSORANORDNUNG**



(57) Abstract: The invention relates to an an SPR surface plasmon resonance spectroscopy sensor for parallel measurement of a plurality of samples, comprising a body (1a) having several SPR sensor areas (2) for guiding radiation in order to carry out SPR measurements and which are coated with a material which is suitable for SPR in such a way that each SPR sensor area (2) can be exclusively associated with a single sample. The radiation conducting body (1a) forms a unit with the SPR sensor areas (2), whereby the path of the rays guided by the SPR sensor areas (2) can also extend through the radiation conducting body (1a).

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein SPR-Sensor für die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie, zur parallelen Messung einer Vielzahl von Proben, umfassend einen Körper (1a), welcher mehrere SPR-Sensorbereiche (2) zur Führung von Strahlung für SPR-Messungen aufweist, die mit einem SPR-geeigneten Material beschichtet sind, und Trennmittel (7), welche die SPR-Sensorbereiche (2) so trennen, dass jeder SPR-Sensorbereich (2) nur einer Probe zuordenbar ist, wobei der Körper (1a) strahlungsleitend ist und mit den SPR-Sensorbereichen (2) eine Einheit bildet, so dass der Strahlengang der durch die SPR-Sensorbereiche (2) geführten Strahlung auch durch den strahlungsleitenden Körper (1a) verläuft.

WO 01/63257 A1

SPR-Sensor und SPR-SensoranordnungGebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung von SPR-Sensoren, die zur gleichzeitigen Erfassung einer Vielzahl von Proben befähigt sind, Verfahren zu deren Herstellung, Messanordnungen zum parallelen Auslesen der erfindungsgemäßen Sensoren sowie deren Verwendung bei der Wirkstoffsuche und dem Hochdurchsatzscreening.

10 Hintergrund der Erfindung

Durch die weiter vorangetriebene Automatisierung im Bereich der Wirkstoffsuche ist die Fragestellung der Miniaturisierung und Parallelisierung von immer größerem Interesse. Die Miniaturisierung von Probengefäßen und Syntheseapparaturen und die Parallelisierung der ablaufenden Prozesse bedingt eine Vielzahl an zu untersuchenden Substanzen mit immer weniger Volumen. Daher ist es bei der Realisierung neuartiger Detektions- und Sensorsysteme notwendig, diese so auszubilden, dass gleichzeitig mehrere Messungen parallel ablaufen bzw. eine große Anzahl von Proben innerhalb kürzester Zeit hintereinander gemessen werden können und die dafür benötigten Substanzmengen minimiert werden (Hochdurchsatzscreening). Eine wichtige Rolle kommt dabei der Erhöhung des Automatisierungsgrades zu.

Weiterhin besteht die Notwendigkeit auch die für die Messung verwendeten Sensoren in einem parallelen und miniaturisierten Format vorzusehen, so dass die Messungen einer Vielzahl von Proben in kürzester Zeit und mit minimalem Probenvolumen und -verbrauch, realisiert werden können, um damit den Durchsatz an zu charakterisierenden Substanzen zu erhöhen.

Es ist eine sehr empfindliche Meßmethode zur Charakterisierung von Grenzflächen bekannt, die als Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie, üblicherweise als SPR, (Surface Plasmon Resonance) in der Literatur

bezeichnet wird. Die Methode beruht auf der optischen Anregung von Oberflächen-Plasmonen entlang der Grenzfläche von Metallschichten.

- 5     Dabei wird üblicherweise das an einer dünnen Goldschicht reflektierte Licht detektiert. Bei geeigneter Resonanzbedingung (Einfallswinkel und Wellenlänge des Lichtes und Schichtdicke der Goldschicht) nimmt die Intensität des reflektierten Lichtes ab. Bei der Absorption des Lichtes  
10    werden Ladungsdichtewellen des Elektronengases an der Goldoberfläche angeregt. Diese Ladungsdichtewellen nennt man Plasmaschwingungen, ihre quantisierten Anregungszustände Plasmonen.
- 15    Um die Resonanz zu beobachten, gibt es zwei methodische Ansätze. Entweder benutzt man monochromatisches Licht und zeichnet die Intensität des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit des Einfallswinkels auf, oder man hält den Einfallswinkel konstant und variiert die Wellenlänge des  
20    Lichtes. In beiden Fällen wird die Lage der Resonanz verschoben, wenn sich der Brechungsindex des Mediums ändert, welches sich auf der dem Lichteinfall abgewandten Seite der Goldschicht befindet.
- 25    Diese Methoden sind unter anderem nach dem Stand der Technik ausführlich von Striebel, Ch.; Brecht, A.; Gauglitz, G. in Biosensors & Bioelectronics 9 (1994), 139-146 beschrieben. Die Resonanzbedingungen für die Anregung der Oberflächen-Plasmonen hängen stark von den optischen Eigenschaften des  
30    die Metallschicht umgebenden Dielektrikums ab. Die Bestimmung von Brechzahl oder Schichtdicke dünner dielektrischer Schichten ist grundsätzlich nach dem bekannten Stand der Technik mit einer hohen Genauigkeit möglich.
- 35    Die SPR-Spektroskopie findet zunehmend z.B. in der biochemischen Analytik Anwendung, da mit ihr die direkte und markierungsfreie Untersuchung der Wechselwirkung zwischen

Interaktionspartnern möglich ist (zum Beispiel bei Biomolekülen Antikörper/Antigen-Reaktionen). Dazu wird ein Interaktionsspartner (z.B. Ligand) auf der Metalloberfläche immobilisiert, der andere Interaktionspartner (z.B. Analyt) wird in Lösung über die Oberfläche geleitet. Die Wechselwirkung ist als Schichtdickenzuwachs über die Brechzahländerung direkt nachweisbar.

Eine mit der Miniaturisierung und parallelen Messung vieler Proben einhergehende zu lösende Aufgabe ist das Inkontaktbringen der Sensorfelder mit Flüssigkeit, ohne dass beispielsweise Kreuzkontamination auftritt.

Herkömmliche SPR-Sensoren verwenden bei der Wirkstoffsuche ein Prisma, das eine dünne Metallschicht trägt. Die zu messende Probe wird mit dem Metall bzw. der modifizierten Metalloberfläche in Kontakt gebracht, und das SPR-Reflexionsspektrum der Probe wird durch Einkoppeln von Licht in das Prisma und Messen der Intensität des reflektierten Lichts als Funktion des Einfallswinkels gemessen. (Vgl. Kapitel 8, "Small Molecule Drug Screening based on Surface Plasmon Resonance" in *Advances in Drug Discovery Techniques*, John Wiley & Sons Ltd., London 1998)

Einen parallelen Ansatz zur Analyse eines Probenarrays stellt die SPR-Mikroskopie (SPM) dar (siehe z.B. EP 388 874 A2 oder M. Zizlsperger, W. Knoll, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 1998, 109, S. 244-253). Hier wird die auf einem Prisma angebrachte Goldoberfläche an verschiedenen Bereichen mit verschiedenen Proben belegt und eine Abbildung der Goldoberfläche unter dem SPR-Winkel auf einen CCD-Chip erzeugt. Während des Messvorgangs wird der Winkel mit einer mechanischen Abtastvorrichtung bzw. Scanvorrichtung geändert. Diese Methode ist jedoch auf kleine Objektdurchmesser beschränkt.

Eine neuere SPR-Methode wird in WO 94/16312 A1 offenbart. Hier wird die Detektion der Bindung geringer Stoffmengen mittels Lichtleitfasern realisiert, die teilweise mit einer Goldschicht belegt sind. Aber auch hier besteht das Problem  
5 in der Konstruktion eines Sensorarrays, das nach diesem Prinzip viele Proben parallel untersuchen soll. Denn ein solcher Array von goldbeschichteten Fasern ist einerseits teuer und sehr empfindlich gegen mechanische Verspannungen, andererseits ist die parallele Herstellung des Arrays nach  
10 dortigem Vorschlag technisch nur schwer realisierbar.

Lichtleitfasern werden auch in WO 98/32002 A1 verwendet. Zum Schutz gegen mechanische Beschädigung befindet sich das Faserkabel in einer Pipette. Zur Realisierung eines Arrays  
15 wird das Aneinanderreihen solcher Pipetten vorgeschlagen. Eine Miniaturisierung ist jedoch schwer zu realisieren, insbesondere bei der parallelen Messung vieler verschiedener Proben.

20 WO 97/15819 A1 beschreibt einen Zweikanalsensor bestehend aus einem Objektträger, wie er in der Mikroskopie verwendet wird. Die Flüssigkeitszufuhr zum Gold-Sensorfeld wird mit Hilfe einer Flusszelle realisiert. Ein solcher Aufbau ist insbesondere bei miniaturisiertem HTS aufwendig.

25 Aus US-5,485,277 ist eine SPR-Sensoranordnung bekannt, welche einen Wellenleiter verwendet, der so gestaltet ist, dass darin eine Mehrfachreflexion stattfindet, womit die Signalauswertung vereinfacht wird. Zur Messung können mehrere  
30 räumliche Kanäle vorgesehen werden, z.B. ein Sensorkanal und ein Referenzkanal. Es wird aber nicht erwähnt, wie die getrennten Kanäle erzeugt werden.

Aus DE-196 15 366 A1 ist ein Verfahren und eine Einrichtung  
35 bekannt, um eine Vielzahl von z.B. matrixartig angeordneten Proben gleichzeitig zu messen. Die Trennung der Proben erfolgt durch räumlich getrenntes Aufbringen der Proben.

WO-99/41594 beschreibt ein SPR-System, bei dem zur besseren Zeitauflösung die Materialeigenschaften von Bereichen, die an eine durchgehende SPR-fähigen Schicht angrenzen, modifiziert werden, um eine räumlich oder zeitlich aufgelöste Bestimmung der Intensität der von der Oberfläche reflektierten Strahlung zu ermöglichen.

WO-90/05295 beschreibt ein SPR-System, welches eine Vielzahl von Sensoroberflächen aufweist. Das SPR-Sensorsystem besteht aus einer Glasplatte, die mit einer Metallschicht überzogen ist, worauf wiederum ein dielektrischer Film aufgebracht ist. Die Liganden, welche eine Messung ermöglichen, werden auf den dielektrischen Film aufgebracht. Die getrennten Sensorbereiche werden durch die getrennte Aufbringung der Liganden erzeugt.

Eine weitere Möglichkeit zur gleichzeitigen Erfassung einer Vielzahl von Proben ist in WO 99/60382 A1 beschrieben, aus welcher der Oberbegriff des Patentanspruchs 1 bekannt ist. Bei der beschriebenen Anordnung sind auf einem planaren Träger mehrere streifenförmige Lichtwellenleiter in einem definierten Abstand angeordnet und mit einer die Anregung von Oberflächen-Plasmonen ermöglichenden dünnen Metallschicht versehen, wobei Mittel vorgesehen sind, die die Erfassungsbereiche der einzelnen dünnen Metallschichten durch Unterbrechung der Metallschicht voneinander derart trennen, dass jeder der Lichtwellenleiter nur eine Probe zuordenbar ist.

Der in WO 99/60382 A1 beschriebenen Lichtwellenleiter ist auf einer Trägerplatte fixiert. Dies erfordert eine sehr hohe Präzision bei der Herstellung. Die lichtführende Schicht wird in einem eigenen Beschichtungsschritt aufgebracht, wobei Inhomogenitäten von Sensor zu Sensor auftreten können. Bei Eindringen von Lösemittel in die entstandene Grenzschrift

zwischen Träger und lichtführender Schicht können sich Probleme mit der Haftung der aufgetragenen Schicht ergeben.

#### Aufgabe der Erfindung

5

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, SPR-Sensoren, welche vorzugsweise planar sind, und Messanordnungen bereitzustellen, die einen einfacheren Aufbau haben, sowie Verfahren zu deren Herstellung, die  
10 kostengünstiger als die nach bekanntem Stand der Technik sein sollen, die befähigt sind, eine Vielzahl von Proben gleichzeitig zu erfassen. Insbesondere sollen SPR-Sensoren geschaffen werden, welche eine lichtführende Schicht enthalten, die mindestens zwei Sensorflächen enthält, sowie  
15 eine Arrayanordnung aus mindestens zwei SPR-Sensoren bereitgestellt werden, wobei die Nachteile der WO 99/60382 A1 vermieden werden sollen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

20

Gelöst wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 und durch die Gegenstände der nebengeordneten Ansprüche. Bevorzugte Ausführungen werden in den Unteransprüchen beschrieben.

25

Erfindungsgemäß wird für einen SPR-Sensor, der zur parallelen Messung einer Vielzahl von Proben geeignet ist, eine selbsttragende Struktur geschaffen, bei welcher ein SPR-Sensorbereiche tragender Körper selbst strahlungsleitend ist  
30 und selbst an der Strahlführung für die SPR-Messung teilnimmt.

Unter Strahlung soll hierbei jede zur Anregung von Plasmonen geeignete Strahlung gemeint sein, insbesondere  
35 elektromagnetische Strahlung, welche aus dem IR-Bereich oder dem sichtbaren Bereich stammt. Diese bevorzugte Strahlung wird manchmal auch einfach als Licht bezeichnet, wobei



hiermit jedoch keine Beschränkung auf sichtbares Licht gemeint ist.

- 5 Durch den erfindungsgemäßen Aufbau eines SPR-Sensors werden die Nachteile des Standes der Technik (insbesondere der WO 99/60382 A1) hinsichtlich der Herstellungsprobleme überwunden, da eine Vielzahl von strahlungsführenden SPR-Sensorbereichen in einem Sensor vorgesehen werden kann, ohne dass ein gesonderter Träger vorgesehen werden muss. Dadurch ist der erfindungsgemäße SPR-Sensor nicht nur einfacher in der Herstellung, sondern auch kompakter als bekannte gattungsgemäße SPR-Sensoren. Dies erleichtert unter anderem die Integration von mehreren SPR-Sensoren zu einer SPR-Sensoranordnung.
- 10
- 15 Gegenüber dem Stand der Technik nach DE-196 15 366 A1, US-5,485,277, WO-99/41594 oder WO-90/05295 weist die vorliegende Erfindung den Unterschied und Vorteil auf, dass die Trennung der SPR-Sensorbereiche durch eine Unterbrechung der SPR-fähigen Schicht erfolgt, so dass eine klare und eindeutige Trennung der einzelnen Probenbereiche von vornherein gegeben ist, und keine komplizierten Belegungstechniken für die Liganden oder Messmaterialien verwendet werden müssen.
- 20
- 25 Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Sensoren bzw. Sensoranordnungen sind winkelabhängige Messungen möglich, die aufgrund der geringen Abmessungen mit einem Lichtwellenleiter prinzipiell nicht durchgeführt werden können.
- 30 Obwohl die erfindungsgemäßen SPR-Sensoren aus zunächst getrennt vorliegenden SPR-Sensorbereichen und einem Körper zusammengefügt werden können, werden die SPR-Sensoren vorzugsweise ausgehend von einem einzigen strahlungsleitenden Substrat hergestellt, in welchem SPR-Sensorbereiche gebildet werden, welche auf einer Oberfläche eine SPR-geeignete bzw. SPR-fähige Beschichtung passender Dicke aufweisen (z.B. Platin, Gold, Silber, Aluminium, Kupfer, Nickel, oder
- 35

geeignete Legierungen), wobei unter Umständen eine haftvermittelnde Zwischenschicht (z.B. Chrom) eingefügt ist. Diese im Substrat gebildeten SPR-Sensorbereiche, in welche Strahlung eingekoppelt werden kann und durch welche diese Strahlung geführt werden kann, um Oberflächen-Plasmonen in der SPR-Schicht anzuregen, und um die durch den SPR-Effekt (d.h. eine wellenlängenabhängige oder winkelabhängige Intensitätsverminderung, welche über die dielektrischen Eigenschaften der Außenseite der SPR-Schicht Auskunft gibt) modifizierte Strahlung weiter zu einer Auswerteeinrichtung zu führen, sind durch Trennmittel getrennt, so dass die Strahlung, welche aus getrennten SPR-Sensorbereichen stammt, getrennt erfasst werden kann. Die Trennmittel sorgen auch dafür, dass jeder SPR-Sensorbereich einer auszumessenden Probe zugeordnet werden, d.h. dass keine Kontamination zwischen benachbarten SPR-Sensorbereichen stattfindet.

Gemäß eines ersten prinzipiellen Aufbaus werden die Trennmittel durch die Aufbringung von Erhebungen auf der Oberfläche des Substrats gebildet, welche sich zwischen den SPR-Schichten befinden, wobei der Stoff aus denen diese Erhebungen bestehen, so gewählt ist, dass keine Strahlungsausbreitung in den Bereichen des Substrats zwischen den SPR-Sensorbereichen stattfindet, z.B. indem diese Strahlung durch diesen Stoff absorbiert wird. Hierzu muss der Brechungsindex des Stoffs geeignet gewählt werden, um eine Totalreflexion in den Zwischenbereichen zu verhindern, und der Stoff muss strahlungsabsorbierend bzw. dämpfend wirken. Wenn das Substrat aus Glas besteht, ist z.B. Silizium oder eine Siliziumverbindung hierzu geeignet. Im übrigen sind die Erhebungen so gewählt, dass sie eine Fluidbarriere darstellen, so dass keine Kontamination zwischen benachbarten Proben bzw. Sensorbereichen stattfindet.

Wie man erkennt, bildet bei dem ersten prinzipiellen Aufbau das Substrat selbst den tragenden Körper für die SPR-Sensorbereiche, da diese SPR-Sensorbereiche und die

Trennbereiche integrale Bestandteile des Substrats sind, und das Substrat in seinem Volumen unverändert bleibt. Lediglich die Oberfläche wird verändert, um die entsprechenden Sensorbereiche bzw. Trennbereiche im Inneren des Substrats zu  
5 definieren. Somit findet jede Strahlungsleitung bzw. Strahlungsführung in den Sensorbereichen auch im tragenden Körper bzw. Substrat statt.

Gemäß eines zweiten prinzipiellen Aufbaus werden die  
10 Trennmittel durch Ausnehmungen im Material des Substrats zwischen den SPR-Sensorbereichen gebildet. Diese Ausnehmungen können durch jedes geeignete Verfahren gebildet werden, z.B. durch Sägen, Fräsen, Ätzen, usw. Hierdurch bilden die SPR-Sensorbereiche Finger, welche vom verbleibenden  
15 ursprünglichen Substrat abstehen, wobei dieses verbleibende ursprüngliche Substrat den tragenden Körper für die Sensorbereiche bildet. Allerdings sind die Finger strahlungsleitend mit dem Restsubstrat bzw. Körper verbunden, und die in die Sensorbereiche eingekoppelte Strahlung läuft  
20 auch durch den Körper. Der zweite prinzipielle Aufbau hat den besonderen Vorteil, dass die abstehenden Finger, welche SPR-Sensorbereiche darstellen, in einem geeigneten Raster angeordnet werden können, und solche geeignet gerasterten SPR-Sensoren zu Sensoranordnungen bzw. Sensorarrays  
25 zusammengesetzt werden können, welche mit Mikrotiterplatten entsprechenden Formats zusammenwirken können. Hierdurch werden besonders effiziente SPR-Sensorarrays für das Hochdurchsatzscreening geschaffen.

30

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Weitere Merkmale, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden  
35 Erfindung gehen aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung bevorzugter Ausführungen hervor, welche auf die Zeichnungen Bezug nehmen, in welchen:

Figur 1a eine Ausführung des ersten prinzipiellen Aufbaus  
eines Sensors zeigt, bei der die Länge der  
Oberflächenbeschichtung des SPR-Materials und des  
Trennmaterials entlang der gesamten Höhe des  
Sensors verläuft,

Figur 1b eine weitere Ausführung des ersten prinzipiellen  
Aufbaus zeigt, bei der die Länge der Beschichtung  
des SPR-Materials und des Trennmaterials nicht  
entlang der gesamten Höhe des Sensors verläuft,

Figur 2a und 2b  
den Strahlengang der Strahlung, bei dem die  
Lichteintritts- und austrittsflächen auf  
entgegengesetzten Seiten des SPR-Sensorbereichs  
liegen,

Figur 2c den Strahlengang der Strahlung zeigt, bei dem die  
Eintrittsfläche mit der Austrittsfläche identisch  
ist,

Figur 2d eine schematische Perspektivansicht zeigt, welche  
die Wirkung der Sensorbereiche und der  
Trennbereiche veranschaulicht,

Figur 3 eine Querschnittsansicht eines Sensors nach dem  
ersten prinzipiellen Aufbau zeigt,

Figuren 4a und 4b  
mögliche Arrayanordnungen von Sensoren nach dem  
ersten prinzipiellen Aufbau zeigen,

Figur 5a und 5b  
weitere mögliche Ausführungsformen eines Sensors  
und eines entsprechenden Sensorarrays zeigen,

- Figur 6a einen Sensor nach dem zweiten prinzipiellen Aufbau zeigt,
- Figur 6b eine mögliche Arrayanordnung mehrerer Sensoren nach  
5 Fig. 6a zeigt,
- Fig. 7a schematisch eine mögliche Ausführung einer  
Messanordnung für die winkelabhängige Messung,
- 10 Fig. 7b einen vergrößerten Ausschnitt aus dem Strahlengang  
innerhalb der lichtführenden Schicht nach Fig. 7a  
zeigt, und
- Fig. 8 schematisch eine mögliche Ausführung einer  
15 Messanordnung für die wellenlängenabhängige Messung  
zeigt.

#### Ausführliche Beschreibung von Ausführungen der Erfindung

- 20 Die Figuren 1a und 1b zeigen Ausführungen des ersten  
prinzipiellen Aufbaus eines erfindungsgemäßen Sensors 10.  
Dieser besteht aus einer optisch lichtführenden Schicht 1  
bzw. allgemein aus einem strahlungsleitenden Substrat 1, das  
aus einem einheitlichen Material gefertigt ist. Zur  
25 Vereinfachung der Beschreibung wird die Abmessung entlang der  
abgebildeten x-Achse als Breite bezeichnet, die Abmessung  
entlang der abgebildeten y-Achse als Höhe, und die Abmessung  
senkrecht zur x-y-Ebene (Blattebene) als Dicke.
- 30 Das Substrat 1 trägt Sensorflächen 2, die durch Bereiche 3  
getrennt sind, die eine regelmäßige Beabstandung  
gewährleisten. Vorzugsweise sind die Flächen 2 und 3  
streifenförmig, parallel und gleich beabstandet, wie  
abgebildet. Die Sensorflächen 2 bestehen aus einer SPR-  
35 fähigen Schicht, vorzugsweise einer Metallschicht aus Platin,  
Silber, Aluminium, Kupfer, Nickel, besonders bevorzugt einer  
Goldschicht. Zusätzlich sollte zwischen lichtführender

- Schicht bzw. Substrat und Sensorschicht zur besseren Haftung eine haftvermittelnde Schicht aufgebracht werden (nicht dargestellt), z.B. aus Chrom oder Titan. Die Bereiche 3 trennen die Sensorflächen derart, dass eine Kontamination eines Nachbarfeldes bei Inkontaktbringen des entsprechenden Sensorfeldes mit Flüssigkeit vermieden werden kann. Dies wird z.B. dadurch bewirkt, dass die Trennbereiche 3 als Erhebungen ausgebildet sind, wie in der Perspektivansicht der Fig. 2d oder der Querschnittsansicht der Fig. 3 gezeigt. Weiterhin dient der Bereich 3 dazu, das Licht, welches nicht an der Sensorfläche reflektiert wird, zu absorbieren. Hierzu sollte das Material der Trennbereiche 3 einen gegenüber dem Brechungsindex des Substratmaterials geeigneten Brechungsindex haben, damit nämlich eine Totalreflexion an der Grenzfläche vermieden wird, und eine Absorption stattfinden kann. Hierbei ergibt sich ein Strahlengang, wie er schematisch in Fig. 2d dargestellt ist. In Fig. 2d wird zur Detektion der SPR geeignete Strahlung, z.B. im sichtbaren Wellenlängenbereich, von unten eingestrahlt, und an der zum Einstrahlenden entgegengesetzten Ende tritt entsprechend der SPR-Sensorbereiche vereinzelte Strahlung aus, so dass eine getrennte Analyse der aus verschiedenen Sensorbereichen austretenden Strahlung erfolgen kann.
- In Fig. 1a nehmen die Sensorflächen 2 und die Bereiche 3 die gesamte Höhe des Sensors 10 ein. In Fig. 1b wird jeweils nur ein Teil der Gesamthöhe benutzt. Ebenso können die Bereiche 3 die gesamte Höhe und die Sensorflächen jedoch nur einen Teil der Höhe des lichtleitenden Materials belegen (nicht dargestellt). Auch ist nicht erforderlich, dass alle Streifen eines Materials die gleiche Höhe haben. Jedoch sollte die Höhe der Trennmittel mindestens der Höhe der Sensorbereiche entsprechen.
- In den Abbildungen der Figur 2a-2c werden Möglichkeiten zur Lichtführung in den Sensorbereichen als Seitenansicht von Fig. 1b schematisch dargestellt. Das Licht wird am

Eintrittsfenster bzw. der Eintrittsfläche 4 des Sensorstreifens 1, dessen Fläche senkrecht zur Sensorfläche 2 steht, eingestrahlt und innerhalb der lichtleitenden Schicht 1 mittels Totalreflexion geführt. Es tritt im Fall der Fig. 5 2a und 2b auf der entgegengesetzten Seite zum Eintrittsfenster 4 aus, d.h. durch die Austrittsfläche 41. Hierbei wird das Anregungslicht auch an der Sensorfläche 2 reflektiert. Bei einer geraden Anzahl von Reflexionen tritt das Licht parallel versetzt aus dem Sensorstreifen 1 aus und 10 bei einer ungeraden Anzahl von Reflexionen spiegelbildlich hierzu zur Seite des Lichteinfalls. Der Einstrahlwinkel  $\alpha$  sollte ferner so gewählt werden, dass der Austritt des Lichtstrahls nur zu einer Seite erfolgt und der SPR-Effekt optimal ausgeprägt ist. Ein weiterer Fall stellt Fig. 2c dar. 15 Hier wird das Licht durch das gleiche Fenster 4 ein- und ausgekoppelt. Um dies zu ermöglichen ist die mit 4a bezeichnete Seite des Sensors verspiegelt, womit das Licht reflektiert wird und durch das Eintrittsfenster wieder austritt.

20 Als Material für das Substrat 1 können sowohl Gläser als auch Polymere (z. B. Polycarbonat, PMMA, ORMOCER®), die eine ausreichend hohe optische Transparenz im Bereich des sichtbaren Lichts bis in den Bereich des nahen infraroten 25 Lichts aufweisen, gewählt werden. Gläser wie Borosilikat- oder optische Gläser allgemein werden hierbei bevorzugt, weil die optische Qualität der Oberfläche und das Medium schliefenfreier und mit geringeren Streueigenschaften behaftet ist als bei herkömmlichen Kunststoffen. Zudem 30 zeichnen sich Gläser durch hohe Chemoresistenz und die für Biosensoren wichtige möglichst geringe unspezifische Proteinadsorption aus.

Der Brechungsindex des Materials sollte vorteilhafter Weise 35 bei Verwendung von Gold als SPR-fähiger Schicht im Bereich 1,46 bis 1,58 liegen, um die Messung des SPR-Signals in einer

Lösung mit dem Brechungsindex zwischen 1,33 bis 1,37 zu ermöglichen.

Der Sensor bzw. das Substrat 1 kann sowohl Dicken D annehmen,  
5 die eine Ausbreitung des Lichts im Sinne der Modenausbreitung  
als auch der geometrischen Optik als Strahlen erlaubt.  
Bevorzugt sind Dicken D zwischen 0,1 mm bis 5 mm. Minimal  
kann der Sensorstreifen 1 eine Höhe H aufweisen, die nur eine  
Reflexion an der Sensorfläche 2 erlaubt bzw. die Dimension  
10 der Sensorfläche 2 besitzt. Eine maximale Höhenbegrenzung ist  
je nach gewünschter mechanischer Stabilität der Streifen  
festzulegen. H und D sind so anzupassen, dass bei gewünschter  
Anzahl von Reflexionen ein SPR-fähiger Winkel erzielt wird.  
Eine zusätzliche Trägerschicht ist nicht erforderlich, kann  
15 jedoch ergänzend aufgebracht werden.

Um ein Übersprechen bei der Flüssigkeitsbeschickung zwischen  
einzelnen Sensorflächen zu vermeiden, kann der Trennbereich  
durch eine Erhebungen 3 bildende Deckschicht - wie in Figur 3  
20 dargestellt - in Form einer Flüssigkeitsbarriere ausgestaltet  
sein. Die Deckschicht soll weiterhin absorbierend wirken, um  
die Unterteilung der flächigen Anregung in den einzelnen  
Sensorflächen durch Auslöschung des Lichtes in den Gebieten  
zwischen zwei Sensorfeldern zu gewährleisten. Das Material  
25 der Deckschicht muss somit eine hohe optische Absorption  
gegenüber dem einfallenden Licht haben, sowie eine chemische  
Stabilität gegen die verwendeten Reagenzien und Lösemittel  
besitzen. Ferner soll die Strukturierbarkeit mit bekannten  
mikrotechnischen Verfahren zur Herstellung von Deckschichten  
30 mit Breiten vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 10 mm,  
insbesondere 0,1 bis 1mm möglich sein.

Die Figuren 4a und 4b zeigen zwei mögliche Anordnungen von  
einzelnen Sensoren zu Sensorarrays. Hierbei können eine große  
35 Anzahl, vorzugsweise 10 bis 100000 Sensorbereichen, parallel  
in einem definierten Abstand zueinander angeordnet werden.



Messanordnungen zum parallelen wellenlängenabhängigen Auslesen solcher Sensorarrays sind in DE 199 55 556.7 beschrieben, auf deren diesbezüglichen Offenbarungsgehalt hiermit bezug genommen wird und deren Inhalt hiermit durch  
5 Bezugnahme eingeschlossen wird.

Die gleichzeitige winkelabhängige Messung des SPR-Effekts aller Sensorfelder in einem solchen Array ist apparativ sehr aufwendig. Jedoch kann leicht eine winkelabhängige Messung  
10 des SPR-Effektes von einzelnen Sensoren mittels geeigneter Lichtführung parallel durchgeführt werden, wie später noch beschrieben wird.

Wie in Figur 4a dargestellt, werden zur Bildung einer SPR-Sensoranordnung bzw. SPR-Sensorarrays mehrere der planaren  
15 Sensoren 10 durch Verkleben der Sensoren an der Lichtaustrittsseite mit einer transparenten Deckplatte 6 zu einem Array angeordnet. Der dafür zu verwendende Klebstoff sollte optisch transparent im Bereich des sichtbaren Lichts  
20 bis in den Bereich des nahen infraroten Lichts sein bzw. allgemein durchlässig für die SPR-Strahlung sein, und einen Brechungsindex, ähnlich dem des Glases der Sensoren 10 und Deckplatte 6, aufweisen. 'Ähnlich' bedeutet hierbei einen Unterschied von höchstens 10%. Bei der Herstellung der  
25 Sensoren zu einem Array sollte darauf geachtet werden, dass die planaren, plattenförmigen Sensoren zueinander planparallel angeordnet werden.

Da sich bei diesem Aufbau keine lichtabsorbierenden Bereiche  
30 zwischen den Sensorstreifen befinden, ist es bei jenen Sensorarrays, die nach dem Schema der Fig. 2d beleuchtet werden, notwendig, das Anregungslicht, welches zwischen zwei Sensoren hindurchtritt, auszublenken. Dafür wird über dem  
Array eine Lochmaske 20 angeordnet, welche nur an den Stellen  
35 der Austrittsfenster Öffnungen 21 aufweist und damit Licht, welches nicht mit den Sensorfeldern in Kontakt kommt, ausblendet.

Figur 4b stellt die Anordnung von Sensoren zu einem Array unter Verwendung von Zwischenelementen bzw. Abstandhaltern 5 dar.

5 Die Sensoren werden durch Abstandhalter mit einer definierten Dicke in dem gewünschten Abstand zueinander angeordnet und gegeneinander gepresst oder nach dem Verpressen miteinander verklebt. Die Abstandhalter 5 haben auch die Aufgabe, Licht,  
10 welches nicht in die Sensoren eingekoppelt wird, auszublenden.

Die Seitenflächen der Abstandhalter sollten jedoch zueinander planparallel gefertigt werden, um zu garantieren, dass durch  
15 das Stapeln der Sensoren 10 und Abstandhalter 5 kein Keilfehler von Sensor zu Sensor entsteht. Daher sollte ein Material ohne mechanische Spannung verwendet werden, vorzugsweise das gleiche Material wie das Substrat der Sensoren.

20 Im Fall, dass Glas oder ein anderes strahlungsdurchlässige Material als Material für die Abstandhalter verwendet wird, müssen die Stirnseiten der Abstandhalter zusätzlich mit einer lichtabsorbierenden Schicht versehen werden, die garantiert,  
25 dass kein Licht durch diese Abstandhalter an den Detektor gelangen kann.

Die Verwendung eines Klebstoffs zum Fixieren des Arrays nach dem Stapeln setzt eine abgestimmte Materialauswahl von Sensor  
30 zu Klebstoff voraus. Der Brechungsindex des Klebstoffes muss kleiner als der des Materials der Sensoren sein, damit das Licht im Sensor mittels Totalreflexion geführt werden kann.

Das Einbringen des Klebstoffs in die Spalten zwischen  
35 Sensoren und Abstandhalter kann mittels Kapillarkräften erfolgen. Dadurch kann in einem ersten Schritt der Array

gestapelt werden und in einem zweiten Schritt werden die Sensoren zueinander mit dem Klebstoff fixiert.

5 Werden die Sensoren nur verklemmt, so ermöglicht auch der verbleibende Luftspalt die Totalreflexion des eingestrahnten Lichts.

10 Die Anordnung mehrerer Sensoren zu einem Array erfordert eine genaue Ausrichtung der Sensoren zueinander, da dies für die optische Lichtein- und auskopplung des parallelen Lichtes unter einem definierten Winkel notwendig ist.

15 Der Abstand zwischen zwei Sensorbereichen oder Sensoren bestimmt das für die Anwendung notwendige Volumen und sollte möglichst minimal sein und vorzugsweise im Bereich 0,1 mm bis 10 mm liegen. Nach der Messung wird das Sensorarray aus der Messlösung herausgenommen. Handelt es sich bei dem Abstand von Sensor zu Sensor um einen Kapillarspalt, kann die Flüssigkeit mit porösem Material herausgesaugt, 20 herausgeschleudert oder mit Druckluft in ein Auffanggefäß gespült werden. Bei größeren Spalten laufen diese von selber aus.

25 Verfahren zur Herstellung von Sensoren nach dem ersten prinzipiellen Aufbau sehen mehrere Schritte vor. In einem ersten Schritt können auf der lichtführenden Schicht vor oder nach der mechanischen Bearbeitung der lichteinkoppelnden Stirnflächen die lichtabsorbierenden Bereiche zwischen den Sensorflächen hergestellt werden. Dafür kann eine 30 fotostrukturierbare Schicht verwendet werden, die auf das lichtleitende Substrat aufgetragen und mittels fotolithografischer Methoden strukturiert wird und somit in einem vorgegebenen Raster Bereiche freilegt. Eine in den oben angegebenen Lichtbereichen transparente Trägerplatte, die in 35 ihrer Höhe der Länge der Streifen des lichtleitenden Substrates entspricht, wird mit einer homogenen Schicht Fotolack beschichtet. Diese (Deck-)Schicht ist

fotostrukturierbar im UV und absorbierend im sichtbaren und/oder Infrarotbereich. Dieser Lack wird mittels einer Fotomaske belichtet, entwickelt und ausgehärtet. Danach wird diese Platte in mehrere Streifen bzw. Substrate 1  
5 zerschnitten, deren Stirnseiten anschließend optisch poliert werden. Die Höhe der Streifen wird je nach Anzahl der Reflexionen, die für die SPR-Messungen herangezogen werden, bestimmt. Nach dem Polieren der Stirnseiten werden die Streifen mit einer SPR-fähigen Schicht, wie Gold,  
10 beschichtet.

Es können ebenso Substrate verwendet werden, die bereits die gewünschte Länge aufweisen und deren Stirnflächen poliert sind und die einzeln mit einem der oben genannten Verfahren  
15 die lichtabsorbierenden Stege erhalten. Die Beschichtung mit der SPR-fähigen Metallschicht erfolgt auch hier in einem letzten Arbeitsschritt.

Weiterhin können Siebdrucktechniken eingesetzt werden, die  
20 nur an den Öffnungen der Siebdruckmaske die lichtabsorbierende Schicht auf das lichtleitende Material auftragen. Ebenso kann eine vorstrukturierte Abdeckung mit Öffnungen, die den Sensorflächen entsprechen, mittels Kleben oder anderer Fügeverfahren auf das Material aufgebracht  
25 werden. Die mit diesen Methoden hergestellten freien Bereiche werden in einem nachfolgenden Schritt zunächst mit einer haftvermittelnden Schicht, vorzugsweise einer dünnen Metallschicht versehen. Mittels Sputtern oder Bedampfen wird dann eine dünne SPR-fähige Schicht, beispielsweise aus Gold  
30 aufgetragen. Zuvor wird eine haftvermittelnde Schicht aufgetragen, die dünn (z.B. eine Größenordnung dünner) gegenüber der SPR-fähigen Schicht sein sollte, so dass die SPR- Resonanz möglichst wenig beeinflusst wird. Die  
lichtabsorbierenden Bereiche können mit beschichtet werden,  
35 was die oben beschriebenen Funktionen nicht verändert, weil das Licht nicht bis an diese Schicht vordringt. In anderen Worten, die lichtabsorbierenden Bereiche werden vorzugsweise

als Masken bei der Aufbringung der SPR-fähigen Schicht verwendet.

Die erzeugten Sensorgebiete werden vorteilhafter Weise in  
5 einem Raster, welches den derzeit üblichen  
Mikrotiterplattenformaten entspricht, einem vielfachen oder  
ganzzahlig geteiltem Maß davon zueinander angeordnet. Dies  
erlaubt das Auftragen von Flüssigkeit, beispielsweise Proben  
10 beinhaltend, aus Mikrotiterplatten mittels  
Flüssigkeitstransfergeräten auf die Sensorflächen, die durch  
das Vorhandensein der flüssigkeitsbegrenzenden Barrieren  
nicht auf benachbarte Sensorflächen übersprechen können.

Figur 4a und 4b zeigen die Anordnung einzelner Sensorstreifen  
15 zu einem Sensorarray. Dabei werden durch das Aneinanderfügen  
von m Sensoren des lichtleitenden Substrates mit n-  
Sensorflächen m x n Sensorbereiche bereitgestellt. Die  
Sensoren werden durch Abstandhalter 5 in einem definierten  
Abstand zueinander angeordnet und gegeneinander gepresst,  
20 oder verklebt, oder mittels einer Deckplatte 6 fixiert,  
beispielsweise durch Verkleben.

Die dargestellten einzelnen Sensoren der Lichtleiter können  
mit Hilfe von Pipettierrobotern oder anderen  
25 Flüssigkeitstransfergeräten mit Flüssigkeit in Kontakt  
gebracht werden, bevor sie zu einem Array angeordnet werden.  
Hierzu ist es erforderlich die Sensoren zu legen. Dabei wird  
beispielsweise aus Mikrotiterplatten, die in jeder Kavität  
eine andere Lösung enthält, eine geringe Flüssigkeitsmenge  
30 auf die Sensorfläche gegeben. In einer bevorzugten  
Ausführungsform sind bis zu 96 Sensorflächen auf einem 120 mm  
breiten Sensor herstellbar. Eine weitere Miniaturisierung ist  
mit den genannten Mikrotechnikverfahren möglich.

35 Figur 5a zeigt eine weitere Ausführung, in der Einzelsensoren  
100 hergestellt werden, die zusätzlich einen Abstandhalter 50  
tragen. Die lichtabsorbierenden und flüssigkeitsbegrenzenden

Trennbereiche werden in einem zweiten Material hergestellt und mit dem lichtleitenden Substrat fest verbunden. In diesem Beispiel wird ein Siliziumwafer so strukturiert, dass in einem ersten Bereich 51 Abstandselemente entstehen, und in einem demgegenüber zurückversetzten Bereich 52 offene Bereiche 54 entstehen, die die Sensorregionen freilassen, und ebenfalls Erhebungen bzw. Stege 53 entstehen, die als Fluidbarrieren dienen. Der strukturierte Siliziumwafer, der mehrere Kopien der benötigten Lichtleiterstreifen trägt, wird auf das lichtleitende Substrat gebondet und im Anschluss daran wird dieser Verbund in Streifen bzw. Platten zerteilt und die Stirnflächen poliert. Als letzter Schritt erfolgt die Beschichtung mit der SPR-fähigen Schicht, welche durch die offenen Bereiche direkt auf dem lichtleitenden Substrat abgeschieden wird. Erneut dienen die Trennmittel als Maske.

In Figur 5b ist ein Array aus solchen Sensoren 100 wiedergegeben. Man geht von Einzelsensoren 100 aus, die miteinander so verbunden werden, dass die zwischen den Sensoren 100 befindlichen Kapillarspalten miteinander mäanderförmig verbunden sind und durch eine externe Pumpe befüllt und wieder entleert werden können. In diesem Fall sollten die Sensorregionen auf dem Sensor 100 in einem ersten Schritt mit den zu messenden Proben beschichtet werden und dann mehrere Streifen mittels Verpressen oder Verkleben zu einer Art "Durchfluß-Küvette" verbunden werden.

Figur 6a zeigt eine besonders bevorzugte Ausführung, welche ein Beispiel für den zweiten prinzipiellen Aufbau ist, in der die Trennbereiche 3 durch Ausnehmungen 7 erzeugt werden. Hierbei werden ebenfalls planare, transparente Substrate benutzt, um sowohl einen Sensor mit einer Vielzahl von Sensorfeldern, als auch durch die Anordnung mehrerer Sensoren hintereinander (Array) herzustellen.

In diesem Fall werden die Sensorflächen nicht durch ein lichtabsorbierendes Material, sondern räumlich direkt

getrennt, indem das Material zwischen zwei Sensorgebieten 2 entfernt wird. Dies kann sowohl durch mechanisch abtragende Verfahren realisiert werden, wie zum Beispiel Sägen oder Fräsen, durch Laserabtragsprozesse oder verschiedenste  
5 Ätzverfahren, anzuwenden je nach Materialart und -dicke.

Als Ergebnis bleibt ein tragender Körper 1a, von welchem fingerförmig die Sensorbereiche 2 abstehen.

10 Eine besonders bevorzugte Ausführung eines Sensorarrays zeigt Fig. 6b, das ähnlich wie die Arrays der Figuren 4a und 4b hergestellt wird, unter Verwendung von Sensoren nach Figur 6a.

15 Hierbei sind in den Figuren 6a und 6b Anordnungen mehrerer kammartiger Sensoren wiedergegeben. Die spezielle Geometrie der Finger erlaubt vorteilhafter Weise eine sehr einfache Beschichtung der auf den Fingern befindlichen Goldsensorflächen. Der Abstand der Finger entspricht  
20 bevorzugt dem Raster einer 1536er Mikrotiterplatte und die Ausschnitte sind so dimensioniert, dass die Finger des Sensors oder Sensorarrays in die Kavitäten der Mikrotiterplatte eintauchen können. Damit kann die Beschichtung der Finger sowohl vor als auch nach dem Stapeln  
25 der Sensorstreifen zu einem  $m \times n$  Array erfolgen, da in diesem Fall jede Sensorfläche räumlich von der benachbarten getrennt ist und somit jede Sensorregion für sich in eine Kavität getaucht werden kann. Vorteilhafterweise kann jede Sensorregion mit unterschiedlichen Liganden beschichtet  
30 werden. Die Messung erfolgt dann bevorzugt mit einem einzigen Analyten. Es besteht auch die Möglichkeit unterschiedliche Analyten beispielsweise in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorzulegen und nur einen Liganden zu präsentieren.

35

Es ist auch möglich den ersten prinzipiellen Aufbau und den zweiten prinzipiellen Aufbau zu kombinieren, nämlich in einer

weiteren Ausführung (nicht abgebildet) eines Sensors, der Trennbereiche enthält, die sowohl durch Ausnehmungen als auch durch Deckflächen definiert werden. Somit ist es beispielsweise möglich, dass ein Sensor Sensorbereiche hat, welche abwechselnd durch Ausnehmungen und durch Deckflächen getrennt sind. Es ist ebenfalls möglich eine grundsätzlich kammartige Struktur mit Ausnehmungen zu bilden, wie in Fig. 6a gezeigt, wobei allerdings die einzelnen Finger wiederum unterteilt sind, nämlich durch Deckflächen.

Obwohl die in den Figuren gezeigten Sensoren alle parallele und gleich beabstandete Sensorbereiche haben, was bevorzugt ist, ist es genauso möglich, dass andere Strukturen verwirklicht werden. So kann insbesondere der Abstand und/oder die Breite der Sensorbereiche von einem Sensorbereich zum nächsten variieren, z.B. auf solche Weise, dass eine bestimmte Zahl von schmalen Sensorbereichen untereinander durch schmale Ausnehmungen getrennt sind, um eine Gruppe zu bilden, und von anderen gleichartigen Gruppen durch Ausnehmungen getrennt sind, die breiter sind als die schmalen Ausnehmungen innerhalb einer Gruppe.

Ein einzelner Sensor oder auch ein Sensorarray wird mit parallelem oder fokussiertem Licht beleuchtet. Unter der Voraussetzung, dass das Licht nicht senkrecht in die Sensoren eingestrahlt wird, tritt nur das Licht in den Sensor ein, welches durch die Stirnseiten der "Finger" bzw. Sensorbereiche in den Sensorstreifen eingestrahlt wird. In der lichtführenden Schicht wird das Licht an den Sensorflächen reflektiert. Unter den geeigneten Resonanzbedingungen kommt es zur Ausbildung einer Ladungsdichtewelle entlang der Grenzfläche zwischen Gold und Flüssigkeit und die Intensität des reflektierten Lichtes wird abgeschwächt. Die Wellenlängen- oder Winkelabhängigkeit der Intensität des reflektierten Lichts kann eine mit dem Sensor in Kontakt gebrachte Flüssigkeit charakterisieren.



Das in den Sensor eingekoppelte Licht verlässt nach mindestens einer Reflexion an der Sensorfläche den Sensor und wird dann zur Auswertung auf eine Detektoreinheit (Det, z.B. CCD-Kamera) abgebildet. Licht, welches nicht in die  
5 Stirnflächen der SPR-Sensorbereiche 2 eingekoppelt wurde oder durch Streuung an Kanten entsteht, wird weitgehend von den Abstandhaltern 5, 50 bzw. der Abdeckung 6 "geblockt" oder es wird in Richtungen reflektiert, die nicht vom Detektor nachgewiesen werden. An der Lichtaustrittsseite der Sensoren  
10 treten Lichtstrahlen an den Stellen aus, unter denen sich eine Sensorfläche befindet; in den Zwischenbereichen tritt kein Licht aus (Fig. 2d).

Neben der Durchleuchtung der Sensorstreifen mit parallelem  
15 Licht, wie es bereits in Figur 2a-2d angedeutet wurde, und einer Messung der Wellenlängenabhängigkeit der transmittierten oder reflektierten Intensität, können die Sensoren auch mit einem fokussierten Strahl beleuchtet werden, um die Winkelabhängigkeit der transmittierten  
20 Intensität zu messen. Dies wird unter Bezugnahme auf Fig. 7a und 7b beschrieben.

Dazu tritt nach Fig. 7b ein durch eine geeignete Fokussiereinrichtung fokussierter Lichtstrahl durch das  
25 Eintrittsfenster 4 in die lichtführende Schicht 1 ein, und wird intern an der aktiven Sensorschicht 2 reflektiert, an der auch der Fokus des Strahls liegt. Nach dieser Reflexion ist der Strahl wieder divergent und tritt aus der lichtführenden Schicht aus. Die Länge und die Anzahl der  
30 Reflexionen sollte in dieser Ausführung begrenzt werden, damit der Querschnitt des divergenten Lichtstrahls nicht breiter als das Austrittsfenster der lichtführenden Schicht wird. Die Ein- und Austrittsfenster sollten vorteilhafter Weise bei dieser Beleuchtungsmethode einen kleinen Winkel zur  
35 Sensornormalen bilden, so dass der zentrale Kern des Lichtstrahls beim Eintritt und -austritt nicht gebrochen

wird. Die Randstrahlen bleiben dann symmetrisch zu diesem zentralen Strahl.

- Durch Messung der Intensität entlang des Querschnitts des austretenden Lichtstrahls erhält man die Winkelabhängigkeit der Intensität des reflektierten Strahls. Ein Messaufbau hierzu kann etwa durch Figur 7a realisiert werden: Das Licht einer kollimierten monochromatischen Lichtquelle im roten oder nahinfraroten Spektralbereich (z.B. HeNe-Laser oder Diodenlaser) wird mittels des Polarisators P zunächst nach der TM Polarisierung bezüglich der Reflexion an der Sensorschicht selektiert. Anschließend erfolgt mit Linsen L2, L3 eine Aufweitung zu einem parallelen Strahl, dessen Querschnitt nun mindestens der Breite des Sensors entsprechen sollte (in dieser Abbildung nicht sichtbar, da der Sensor in die Blattebene hinein ragt). Über einen Umlenkspiegel 1 (UL1) und eine Zylinderlinse Z1 geeigneter Brennweite als Fokussiereinrichtung, wird ein in der Blattebene fokussierter und senkrecht zur Blattebene paralleler Strahl erzeugt. Dadurch ist es möglich alle in die Blattebene hineinragenden Sensoren parallel zu beleuchten und innerhalb eines jeden Sensorbereichs des Sensors einen Fokus auf gleicher Höhe zu erzeugen.
- Der mittlere Winkel  $\Theta$  sollte in etwa dem Winkel entsprechen, unter dem die SPR-Resonanz beobachtet wird. Der Öffnungswinkel des Strahls beträgt ein paar Grad, um einen für die zu erwartende Verschiebung der Resonanz ausreichenden Winkelbereich zu erfassen. Nach der internen Reflexion an der Goldschicht fächert der Strahl wieder auf und tritt nach einer weiteren Reflexion aus der lichtleitenden Schicht heraus. Eine weitere Zylinderlinse Z2 ist im Abstand der Brennweite vor dem Fokus angebracht, so dass anschließend wieder ein paralleler Strahlengang vorliegt. Ein Umlenkspiegel 2 (UL2) und eine Optik aus Linsen L4, L5 bilden die Intensitätsverteilung wie sie in der Ebene der Zylinderlinse 2 vorliegt auf einen Detektor, z.B. einen CCD-

Chip (Det) ab. Dadurch entsteht auf dem CCD Chip (Det) ein Bild, bei dem in der vertikalen Richtung das Winkelspektrum abgebildet wird und in der in die Blattebene hineinzeigenden Richtung die verschiedenen Sensorbereiche des Sensors  
5 benachbart abgebildet sind. Durch diesen Aufbau ist es zwar nur möglich einen einzelnen Sensor parallel auszumessen, ein Vorteil liegt jedoch in der dafür benötigten kürzeren Zeit, so dass z.B. kinetische Experimente durchgeführt werden können. Ein zweidimensionaler Array könnte sequentiell  
10 Zeilenweise mit dieser Anordnung charakterisiert werden, indem dieser Array mit einer Verschiebemechanik durch den Fokus der Optischen Messanordnung geschoben wird.

Messanordnungen zum parallelen Auslesen der SPR-Sensoren oder  
15 Arrays sind in DE 199 55 556.7 beschrieben, auf deren diesbezüglichen Offenbarungsgehalt hiermit bezug genommen wird, und deren Inhalt durch Bezugnahme eingeschlossen wird.

Ein Messaufbau, der nach dem Prinzip eines parallelen  
20 Strahlengangs innerhalb des Sensors (wie in Fig. 2) arbeitet, ist in Fig. 8 dargestellt. Hier wird das Licht einer Halogenlampe durch eine Lichtleitfaser (LLF) zum Monochromator (M) und durch eine weitere Lichtleitfaser zur Strahlaufweitung (Linsen L2, L3) geführt. Mittels des  
25 Polarisators P wird die TM-Polarisation bezüglich der Reflexion an der Sensorschicht selektiert. Die Beleuchtung des Sensorarrays (SA) erfolgt mit einem aufgeweiteten parallelen Strahlenbündel in einem Winkel unter dem die Resonanz erwartet wird.

30 Am oberen Ende des Sensors (siehe auch Fig. 2) tritt das Licht entweder nur parallel versetzt (Fig. 2b) unter dem selben Winkel aus (bei gerader Anzahl von Reflexionen), unter dem es unten eingetreten ist oder um den negativen Winkel bei  
35 einer ungeraden Anzahl von Reflexionen (Fig. 2a). Die Höhe H und Dicke D des SPR-Sensors sind nun so dimensioniert, dass die Anzahl der Reflexionen ungerade ist und somit nur der

negative Winkel auftritt, das Licht also nach rechts oben (Fig. 8) austritt.

Im weiteren Strahlengang wird der Lichtweg der Beleuchtung  
5 praktisch umgekehrt: Über eine Sammellinse L4 mit großem Durchmesser und einem Objektiv L5 wird die Fläche des Sensorarrays auf den CCD Chip (Det) abgebildet (Teleskopabbildung). Da die abzubildende Oberfläche des  
10 Sensorarrays nicht senkrecht zur optischen Achse der Anordnung steht, wird bei einer herkömmlichen Kamera bei der das Objektiv parallel zum CCD Chip (Det) steht aufgrund nicht ausreichender Tiefenschärfe nur eine Linie des Objekts scharf abgebildet. Daher muss bildseitig der CCD Chip (D) ebenfalls zur optischen Achse verkippt sein, um über die ganze  
15 Sensorarrayfläche eine scharfe Abbildung zu gewährleisten. Dies wird realisiert, indem die CCD Kamera (D) mit einem Goniometer gegenüber dem Objektiv (L5) verkippt wird.

Das Bild des Sensorarrays wird zum Rechner DV, der die Rolle  
20 einer zentralen Steuereinrichtung spielt, übertragen, und jedem Sensorbereich wird ein Intensitätswert zugeordnet, indem das Intensitätsintegral über einen dem Sensorbereich zugeordneten Bildbereich gebildet wird. Nach dem Verstellen der Wellenlänge wird ein weiteres solches Bild detektiert und  
25 ausgewertet, und so wird sukzessive ein gesamtes Spektrum für jeden Sensorbereich ermittelt. Bei der Wellenlänge, bei der die Resonanzbedingung erfüllt ist, bricht die detektierte Intensität ein, da dann die Energie des Lichtes in Plasmonenanregung umgewandelt wird. Diesen  
30 Intensitätseinbruch nennt man auch "SPR-Dip". Die Wellenlänge der geringsten Intensität lässt sich numerisch bestimmen, und sie ist charakteristisch für den Brechungsindex der Flüssigkeit vor der Goldschicht.

35 Brechungsindex und Dichte sind für die meisten Proteine gleich, daher ist der Brechungsindex des Mediums vor der Goldschicht direkt proportional zur Massenbelegungsdichte.

Für eine Bestimmung der am jeweiligen SPR-Sensor angelagerten Moleküle ist nun nicht das absolute Intensitätsspektrum einer einzelnen Messung, sondern die Wellenlängenverschiebung des Minimums bei einer Messung in reiner Pufferlösung und zum  
5 Minimum bei einer zweiten Messung in Anwesenheit des Zielmoleküls notwendig. Erst diese Differenz erlaubt, eine Aussage über die Anlagerung von Molekülen zu treffen.

Bei der Verwendung von fokussiertem Licht, wie sie in Figur 7  
10 erkennbar ist, müssen zusätzlich zu der in Fig. 8 beschriebenen Optik noch die Linsen Z1 und Z2 in den Strahlengang gebracht werden. Diese dienen der Fokussierung des Lichtstrahls auf einen Punkt bzw. auf eine Linie. Dort wird die Winkelabhängigkeit des SPR-Effekts zur  
15 Charakterisierung der Lösung verwendet.

Obwohl die Messanordnungen der Figuren 7 und 8 den Fall einer Transmissionsmessung betrafen (siehe auch Fig. 2a und 2b), ist offensichtlich, dass diese Anordnungen grundsätzlich auch  
20 für Reflexionsmessungen verwendet werden können (siehe auch Fig. 2c). Hierzu muss nur beachtet werden, dass dann die Lichteintrittsfläche und die Lichtaustrittsfläche gleich sind, und dementsprechend die Auswerteoptyk angeordnet werden muss. Die Verwendung einer Reflexionsmessung hat den Vorteil,  
25 dass das Licht nicht durch die zu messende Flüssigkeit treten muss.

Die erfindungsgemäßen Sensoren bzw. Arrays finden bei der Wirkstoffsuche und dem Hochdurchsatzscreening Verwendung.  
30

#### Beispiel

Im folgenden wird ein Beispiel für die Herstellung eines Sensors nach Figur 6 erläutert.

35 Ein Borosilikatstreifen wird mit einer Dicke von 0,7 mm verwendet. Die Höhe der Glasstreifen von 17 mm ist so dimensioniert, dass bei Einstrahlung von parallelem Licht

unter einem Winkel von  $83^\circ$  genau drei Reflexionen zugelassen werden.

5 Beide Stirnseiten, in die das parallele Licht ein- und  
ausgekoppelt wird, sind poliert. Die Breite der Streifen  
beträgt 78 mm. Im Abstand von 2,25 mm werden 33 Ausschnitte  
mittels einer Glassäge mit einer Breite von 1 mm und 6 mm  
Tiefe in den Glasstreifen eingebracht. Durch diese  
Ausschnitte entstehen kammähnliche Streifen mit 32  
10 ``Einzelfingern'', die im weiteren als Sensorbereiche dienen.

Nach der Herstellung dieser Fingerstrukturen werden die  
einzelnen Glasstreifen mit einer Klebefolie derart  
beschichtet, dass bis auf 6 mm Länge der Finger der gesamte  
15 Glasstreifen abgedeckt ist. In einem anschließendem  
Beschichtungsprozess werden dadurch nur die unteren 6 mm der  
Finger mit einer SPR-fähigen Goldschicht beschichtet und das  
sonstige Glas nicht durch den Beschichtungsprozess  
beeinflusst. Die Schutzschicht wird nach der Beschichtung der  
20 Streifen entfernt. Zur Beschichtung wurde vorab eine ca. 1nm  
dicke Chromschicht als Haftvermittler aufgetragen. Die danach  
aufgebrachte Goldschicht besitzt eine Dicke von ca. 35 nm.

Ansprüche

1. SPR-Sensor für die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie, zur parallelen Messung einer Vielzahl von  
5 Proben, umfassend  
einen Körper (1; 1a), welcher mehrere SPR-Sensorbereiche  
(2) zur Führung von Strahlung für SPR-Messungen  
aufweist, die mit einem SPR-geeigneten Material  
beschichtet sind, und  
10 Trennmittel (3; 7), welche die SPR-Sensorbereiche (2)  
durch Unterbrechung der Beschichtung mit SPR-geeignetem  
Material so trennen, dass jeder SPR-Sensorbereich (2)  
nur einer Probe zuordenbar ist,  
15 dadurch gekennzeichnet, dass  
  
der Körper (1; 1a) strahlungsleitend ist und mit den  
SPR-Sensorbereichen (2) eine Einheit bildet, so dass der  
Strahlengang der durch die SPR-Sensorbereiche (2)  
20 geführten Strahlung auch durch den strahlungsleitenden  
Körper (1; 1a) verläuft.
2. SPR-Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass  
der Körper (1; 1a) und die SPR-Sensorbereiche (2) aus  
25 ein und demselben strahlungsdurchlässigen Substrat  
gefertigt sind.
3. SPR-Sensor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch  
gekennzeichnet, dass die SPR-Sensorbereiche (2) und die  
30 Trennmittel (3) Bestandteile des Körpers (1) sind, und  
zusammen zumindest einen Teil des Körpers (1) ausmachen.

4. SPR-Sensor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass  
der Körper (1) aus einem durchgehenden planaren  
Strahlungsleiter besteht, und die SPR-Sensorbereiche  
durch erste Flächen auf einer Oberfläche des Körpers (1)  
5 definiert sind, welche aus dem SPR-geeigneten Material  
bestehen, und die Trennmittel durch zweite Flächen  
definiert sind, welche zwischen den Flächen aus SPR-  
geeignetem Material auf der gleichen und/oder  
entgegengesetzten Oberfläche des Körpers aufgebracht  
10 sind, und aus einem zweiten Material bestehen, das  
geeignet ist die Strahlung in dem Strahlungsleiter  
zwischen den SPR-Sensorbereichen auszulöschen.
5. SPR-Sensor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass  
15 die zweiten Flächen auf der gleichen Oberfläche des  
Körpers (1) ausgebildet sind, wie die ersten Flächen,  
und die zweiten Flächen Flüssigkeitsbarrieren zwischen  
benachbarten ersten Flächen bilden.
- 20 6. SPR-Sensor nach Anspruch 4 oder 5, dadurch  
gekennzeichnet, dass die ersten und zweiten Flächen als  
Streifen ausgebildet sind, die ersten Streifen alle  
parallel und gleich beabstandet sind, und der Abstand  
zwischen benachbarten ersten Streifen 0.01 bis 10 mm,  
25 vorzugsweise 0.1 bis 1 mm beträgt.
7. SPR-Sensor nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch  
fingerförmige Vorstände, welche SPR-Sensorbereiche (2)  
umfassen, und Ausnehmungen (7), welche Trennmittel (3;  
30 7) zwischen den Ausnehmungen bilden.
8. SPR-Sensor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass  
die fingerförmigen Vorstände in Sensorbereiche (2)



unterteilt sind, und die Trennmittel (3; 7) zwischen den Sensorbereichen (2) durch weitere Ausnehmungen und/oder durch auf der Oberfläche der Vorstände beschichtete Bereiche gebildet sind.

5

9. SPR-Sensor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorstände den SPR-Sensorbereichen (2) entsprechen, und parallel und mit gleichem Abstand stehen, und zusammen mit dem Körper (1) eine kammförmige Struktur bilden.

10

10. SPR-Sensor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die SPR-Sensorbereiche (2) im Raster einer Mikrotiterplatte beabstandet sind.

15

11. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlung Licht aus dem Infrarotbereich oder dem sichtbaren Bereich ist.

20

12. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Körper (1; 1a) und die SPR-Sensorbereiche (2) aus Glas oder einem Polymer bestehen.

25

13. SPR-Sensor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Körper (1; 1a) und die SPR-Sensorbereiche (2) aus Borosilikatglas bestehen.

30

14. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den SPR-Sensorbereichen (2) und dem jeweiligen SPR-geeigneten Material eine haftvermittelnde Zwischenschicht, vorzugsweise aus Chrom oder Titan, liegt.

15. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das SPR-geeignete Material ein Metall ist, vorzugsweise Platin, Gold, Silber, Aluminium, Kupfer, Nickel oder eine Legierung aus zwei oder mehr dieser Metalle.
16. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Körper (1; 1a) und die SPR-Sensorbereiche (2) einen Brechungsindex aus dem Bereich von 1.46 bis 1.58 aufweisen, und Gold als SPR-geeignetes Material verwendet wird.
17. SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die SPR-Sensorbereiche eine Querschnittsabmessung aufweisen, die im Bereich zwischen 0.1 mm und 5 mm liegt.
18. SPR-Sensoranordnung, umfassend eine Vielzahl von SPR-Sensoren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die SPR-Sensoren planar ausgebildet und alle planparallel angeordnet sind.
19. SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die SPR-Sensoren an einer Strahlungsaustrittsfläche oder Strahlungseintrittsfläche mit einer Oberfläche einer strahlungsdurchlässigen Platte (6) verbunden sind, und auf der entgegengesetzten Oberfläche der Platte (6) eine Strahlungsabdeckung (20) vorgesehen ist, welche Strahlungsdurchtrittsfenster (21) aufweist, die so angeordnet sind, dass ein Durchtritt von Strahlung aus den SPR-Sensorbereichen (2) oder in die SPR-Sensorbereiche (2) der einzelnen SPR-Sensoren gestattet wird.

20. SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils benachbarte SPR-Sensoren (1, 1a, 100) durch Zwischenelemente (5; 50) getrennt sind, welche jeweils mit den benachbarten SPR-Sensoren (2) verbunden sind.
21. SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zwischenelemente (5; 50) so ausgebildet sind, dass sie auf der Seite der SPR-Sensoranordnung, aus der die Strahlung aus den Sensorbereichen (2) der SPR-Sensoren austritt, keinen Strahlungsausstritt gestatten.
22. SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Zwischenelemente (50) mindestens einen ersten Teil (51) aufweist, welcher mit benachbarten SPR-Sensoren verbunden ist und den Abstand zwischen diesen benachbarten SPR-Sensoren definiert, und einen zweiten Teil (52), welcher zwischen benachbarten SPR-Sensoren einen Freiraum lässt, durch welchen ein Fluid fließen kann, wobei in dem zweiten Teil (52) Öffnungen (64) vorgesehen sind, welche mit SPR-geeignetem Material beschichtete Flächen von SPR-Sensorbereichen (2) eines der SPR-Sensoren freigeben, so dass das durch den Freiraum fließende Fluid mit den mit SPR-geeignetem Material beschichteten Flächen der SPR-Sensorbereichen (2) eines der SPR-Sensoren in Berührung kommen kann.
23. SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Vielzahl der SPR-Sensoren und die Zwischenelemente (50) so angeordnet sind, dass die

einzelnen Freiräume zwischen benachbarten SPR-Sensoren einen mäanderförmigen Flusspfad bilden.

24. SPR-Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 18 bis 23,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass 10 bis 100000 SPR-Sensorbereiche angeordnet sind.

25. Verfahren zur Herstellung eines SPR-Sensors nach  
Anspruch 1, umfassend:  
10 Beschichten von ersten Flächen auf einer Oberfläche eines planaren, strahlungsleitenden Substrats mit dem SPR-geeigneten Material, um die SPR-Sensorbereiche (2) im Substrat zu definieren,  
15 Aufbringen von Erhebungen (3) eines zweiten Materials auf zweiten Flächen, welche zwischen den ersten Flächen liegen, um die Trennmittel (3; 7) zu bilden, wobei das zweite Material so ist, dass die Strahlung in dem  
20 Substrat in Bereichen zwischen den SPR-Sensorbereichen (2) ausgelöscht wird, und die Erhebungen (3) eine Höhe von der Substratoberfläche haben, dass jeder SPR-Sensorbereich nur einer Probe zuordenbar ist, indem jede Erhebung (3) eine Flüssigkeitsbarriere für die mit dem  
25 SPR-Sensor auszumessenden Flüssigkeiten bildet,  
wobei der Schritt der Beschichtung der ersten Flächen vor oder nach dem Schritt des Aufbringens des zweiten Materials erfolgen kann.

30

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst die Erhebungen (3) auf den zweiten Flächen gebildet werden, und danach das SPR-geeignete Material

auf die ersten Flächen aufgebracht wird, unter Verwendung der Erhebungen (3) auf den zweiten Flächen als Maske.

- 5 27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhebungen (3) aus dem zweiten Material mit Hilfe einer Maske hergestellt werden.
- 10 28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Maske eine Siebdruckmaske, eine photostrukturierte Lackschicht, oder eine auf die Oberfläche des Substrats gefügte, vorstrukturierte Abdeckung ist.
- 15 29. Verfahren zur Herstellung eines SPR-Sensors nach Anspruch 1, umfassend:
- Beschichten von ersten Flächen auf einer Oberfläche eines planaren, strahlungsleitenden Substrats mit dem SPR-geeigneten Material, um die SPR-Sensorbereiche (2) im Substrat zu definieren,
- 20
- Bilden von Ausnehmungen (7) zwischen den SPR-Sensorbereichen (2), um die Trennmittel (3; 7) zu bilden,
- 25
- wobei der Schritt der Beschichtung der ersten Flächen vor oder nach dem Schritt des Bildens des Ausnehmungen (7) erfolgen kann.
- 30 30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Bilden der Ausnehmungen (7) durch sägen und/oder fräsen und/oder ätzen des strahlungsleitenden Substrats erfolgt.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat aus Glas oder einem Polymer bestehen.
- 5
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat aus Borosilikatglas bestehen.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass bei dem Schritt der Beschichtung der ersten Flächen, eine haftvermittelnde Zwischenschicht, vorzugsweise aus Titan oder Chrom, zwischen dem Substrat und dem SPR-geeigneten Material aufgebracht wird.
- 10
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass das SPR-geeignete Material ein Metall ist, vorzugsweise Platin, Silber, Aluminium, Kupfer, Nickel, Gold oder eine Legierung aus zwei oder mehr dieser Metalle.
- 15
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat einen Brechungsindex aus dem Bereich von 1.46 bis 1.58 aufweist und Gold als SPR-geeignetes Material verwendet wird.
- 20
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die SPR-Sensorbereiche eine Querschnittsabmessung aufweisen, die im Bereich zwischen 0.1 mm und 5 mm liegt.
- 25
37. Verfahren zur Herstellung einer SPR-Sensoranordnung nach Anspruch 18, umfassend:
- 30

- Verbinden der Lichtseintrittsflächen oder  
Lichtaustrittsflächen der einzelnen SPR-Sensoren mit  
einer Oberfläche einer strahlungsdurchlässigen Platte  
5 (6),
- Anbringen einer Strahlungsabdeckung (20) auf der  
entgegengesetzten Oberfläche der Platte (6), welche  
Strahlungsdurchtrittsfenster (21) aufweist, die so  
10 angeordnet sind, dass ein Durchtritt von Strahlung aus  
den SPR-Sensorbereichen (2) oder in die SPR-  
Sensorbereiche (2) gestattet wird.
38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass  
15 das Verbinden der SPR-Sensoren mit der Platte (6)  
mittels eines transparenten Klebstoffs geschieht, der  
sich vorzugsweise von dem Brechungsindex der Platte (6)  
und/oder der SPR-Sensoren um höchstens 10%  
unterscheidet.
- 20 39. Verfahren zur Herstellung einer SPR-Sensoranordnung nach  
Anspruch 18, umfassend das Verbinden der einzelnen SPR-  
Sensoren durch Zwischenelemente (5; 50), welche jeweils  
mit zwei benachbarten SPR-Sensoren verbunden werden.
- 25 40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass  
die Zwischenelemente (5; 50) mit den SPR-Sensoren  
mittels Klebstoff verbunden werden, und der  
Brechungsindex des Klebstoffs und/oder der  
30 Zwischenelemente kleiner ist als der Brechungsindex der  
SPR-Sensoren.

41. Messanordnung für die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie, zur gleichzeitigen Messung einer Vielzahl von Proben, umfassend
- 5       - einen SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder eine SPR-Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 18 bis 24,
- 10       - eine Strahlungsquelle zum Aussenden von Strahlung einer für SPR-Messungen geeigneten Wellenlänge,
- 15       - eine Strahlungs-Fokussiereinrichtung (Z1) zur Bildung von konvergenter Strahlung aus der von der Strahlungsquelle ausgesandten Strahlung, wobei die konvergente Strahlung so geführt wird, dass sie zumindest in zwei unterschiedliche SPR-Sensorbereiche (2) der SPR-Sensoranordnung über jeweilige Strahlungseintrittsflächen (4) der SPR-Sensorbereiche (2) eintritt, und die Strahlungs-Fokussiereinrichtung (Z1) und die SPR-Sensorbereiche (2) so angeordnet sind,
- 20       dass der Fokus der konvergenten Strahlung auf der Oberfläche des SPR-Sensorbereichs (2) liegt, die mit dem SPR-geeigneten Material beschichtet ist, um von dieser Oberfläche reflektiert zu werden, und
- 25       - eine Strahlungs-Auswerteeinrichtung (Z2, UL1, L4, L5, Det), um die reflektierte Strahlung zu erfassen und zu analysieren.
- 30 42. Messanordnung nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungseintrittsflächen (4) der SPR-Sensorbereiche (2) und die konvergente Strahlung so orientiert sind, dass der Mittenstrahl der konvergenten



Strahlung beim Eintritt in den SPR-Sensorbereich (2) nicht gebrochen wird.

43. Messanordnung nach Anspruch 41 oder 42, dadurch  
5 gekennzeichnet, dass die Strahlungsaustrittsflächen (40) der SPR-Sensorbereiche (2) und die konvergente Strahlung so orientiert sind, dass der Mittenstrahl der konvergenten Strahlung beim Austritt aus den SPR-Sensorbereich (2) nicht gebrochen wird.
- 10 44. Messanordnung nach einem der Ansprüche 41 bis 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungs-Fokussiereinrichtung (Z1) eine Zylinderlinse umfasst, wobei die Zylinderlinse und die SPR-Sensoranordnung so  
15 angeordnet sind, dass die von der Zylinderlinse gebildete konvergente Strahlung gleichzeitig in alle SPR-Sensorbereiche (2) des SPR-Sensors oder eines SPR-Sensors der SPR-Sensoranordnung eintritt.
- 20 45. Messanordnung nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass eine SPR-Sensoranordnung vorgesehen ist, und dass eine Verschiebungseinrichtung vorgesehen ist, welche ausgebildet ist die SPR-Sensoranordnung zu verschieben, damit ein SPR-Sensor nach dem anderen ausgemessen werden  
25 kann.
46. Messanordnung für die Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie, zur gleichzeitigen Messung einer Vielzahl von Proben, umfassend  
30 - einen SPR-Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder eine SPR-Sensoranordnung (SA) nach einem der Ansprüche 18 bis 24,

- eine Strahlungsquelle (L1, LLF, M, P) zum Aussenden von Strahlung einer für SPR-Messungen geeigneten Wellenlänge,
- 5 - eine Strahlungs-Parallelisiereinrichtung (L3) zur Bildung von paralleler Strahlung,
- eine Strahlungs-Führungseinrichtung (UL1) zur Führung der parallelen Strahlung, wobei die Strahlungs-  
10 Führungseinrichtung (UL1) und die SPR-Sensoranordnung so angeordnet sind, dass die parallele Strahlung auf zumindest zwei der SPR-Sensorbereiche (2) der SPR-Sensoranordnung auf solche Weise trifft, dass die  
15 parallele Strahlung über jeweilige Strahlungseintrittsflächen in die SPR-Sensorbereiche (2) eintritt und darin so geführt wird, dass sie von der Oberfläche der SPR-Sensorbereiche reflektiert wird, die mit dem SPR-geeigneten Material beschichtet sind, und  
20 - eine Strahlungs-Auswerteeinrichtung (UL2, L4, L5, Det), um die reflektierte Strahlung zu erfassen und zu analysieren.
- 25 47. Messanordnung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungs-Führungseinrichtung (UL1) und der SPR-Sensor oder die SPR-Sensoranordnung (SA) so angeordnet sind, dass die parallele Strahlung auf alle SPR-Sensorbereiche des SPR-Sensors oder der SPR-  
30 Sensoranordnung (SA) trifft.
- 48. Messanordnung nach Anspruch 46 oder 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungs-Auswerteeinrichtung

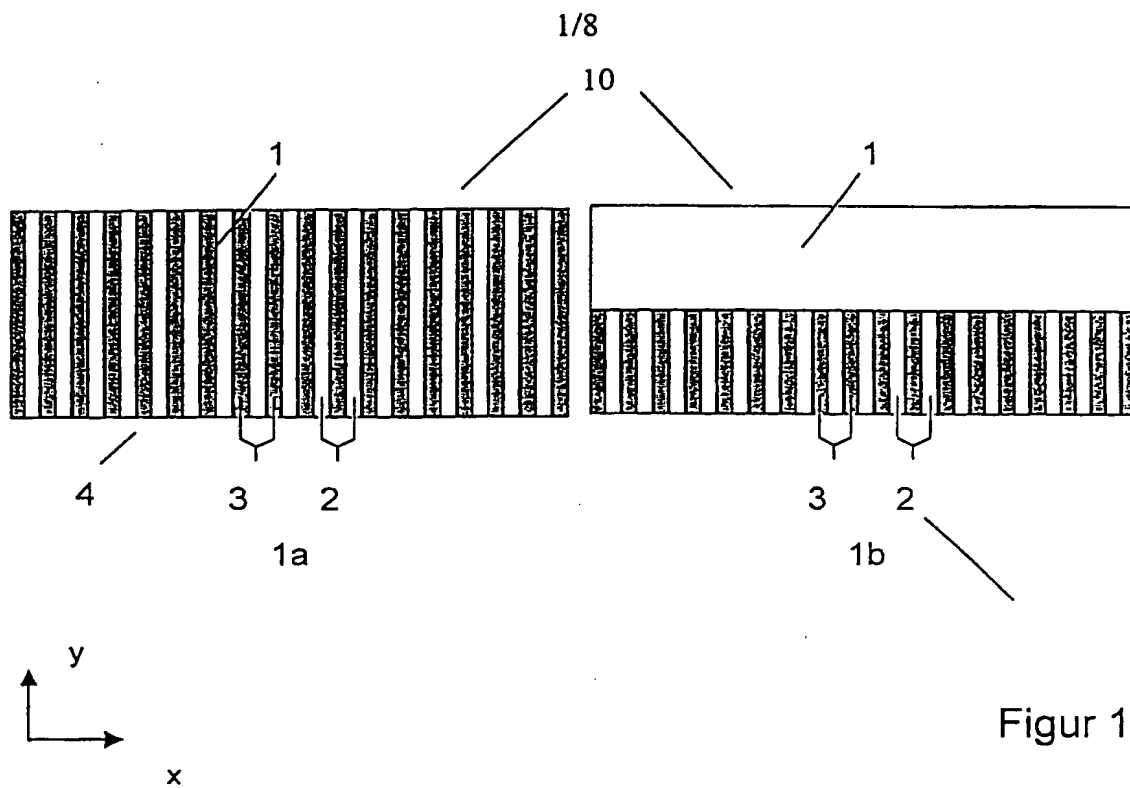
(UL2, L4, L5, Det) eine Abbildungsoptik (L4, L5) und einen Detektor (Det) umfasst, wobei die Abbildungsoptik (L4, L5) die reflektierte Strahlung auf den Detektor (Det) abbildet und der Detektor (Det) eine räumliche  
5 Auflösung der von einzelnen SPR-Sensorbereichen stammenden Strahlung gestattet.

49. Messanordnung nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungs-Auswerteeinrichtung (UL2, L4, L5, Det) eine Einrichtung zur Verkippung des Detektors (Det) gegenüber der optischen Achse der Abbildungsoptik (L4, L5) umfasst.

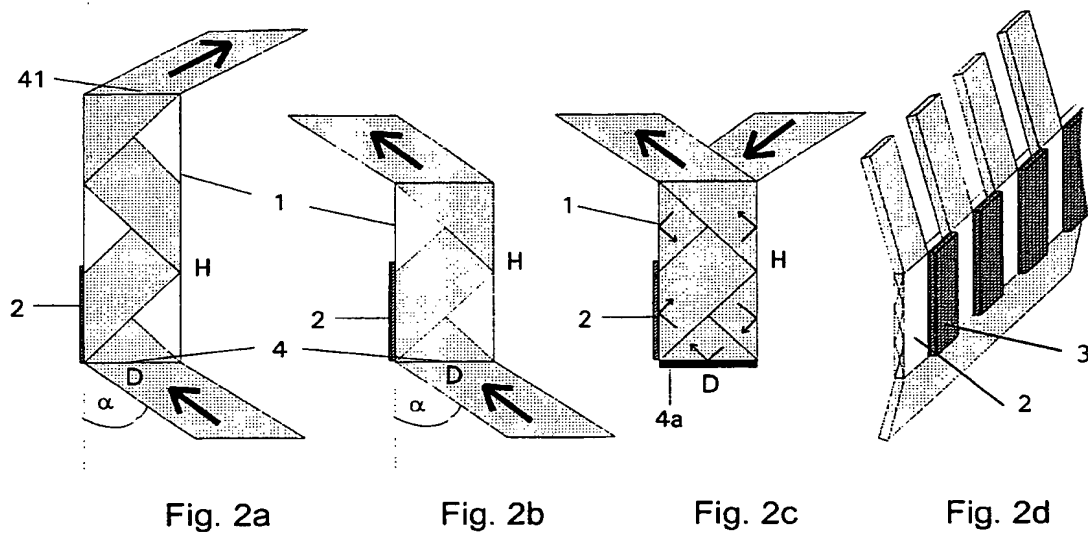
50. Messanordnung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zur Verkippung des Detektors (Det) ein Goniometer ist.

51. Messanordnung nach einem der Ansprüche 48 bis 50, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor (Det) einen  
20 CCD-Chip umfasst.

52. Messanordnung nach einem der Ansprüche 46 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass eine Steuereinheit (DV) vorgesehen ist, welche mit der Strahlungsquelle (L1, LLF, M, P) und der Strahlungs-Auswerteeinrichtung (UL2, L4, L5, Det) verbunden ist, und so ausgebildet ist, dass sie die Wellenlänge der von der Strahlungsquelle (L1, LLF, M, P) ausgestrahlten Strahlung einstellen kann, und die bei einer eingestellten Wellenlänge von der  
25 Strahlungs-Auswerteeinrichtung (UL2, L4, L5, Det) erfasste Intensität der von einzelnen SPR-Sensorbereichen (2) stammenden Strahlung erfassen und speichern kann.

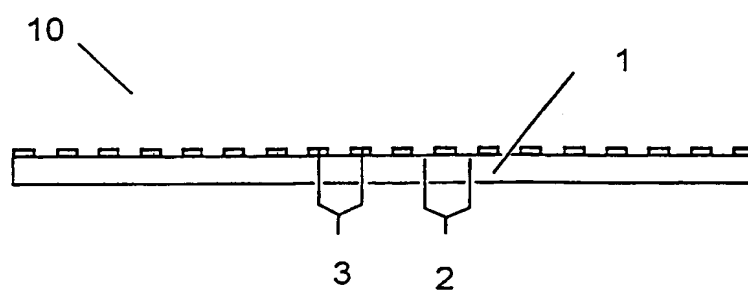


Figur 1



Figur 2

3/8



Figur 3

4/8

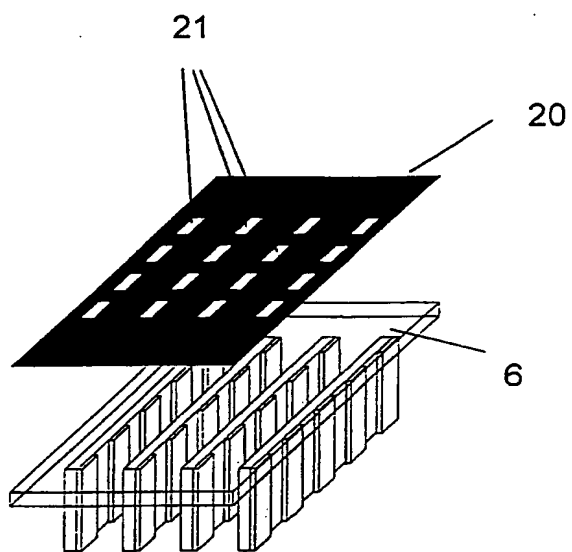


Fig. 4a

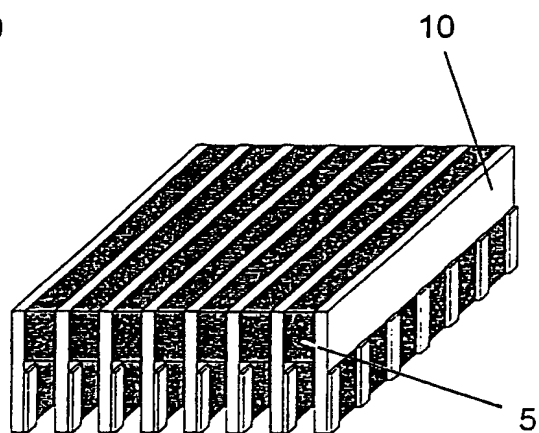
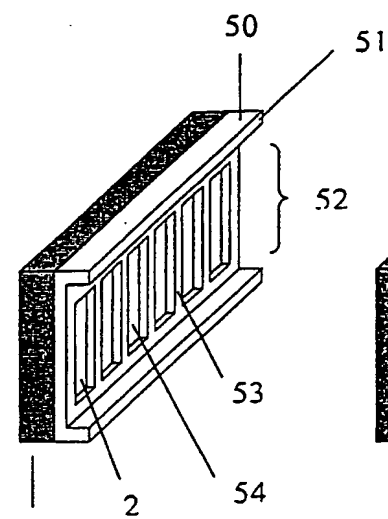


Fig. 4b

Figur 4



100

Fig. 5a

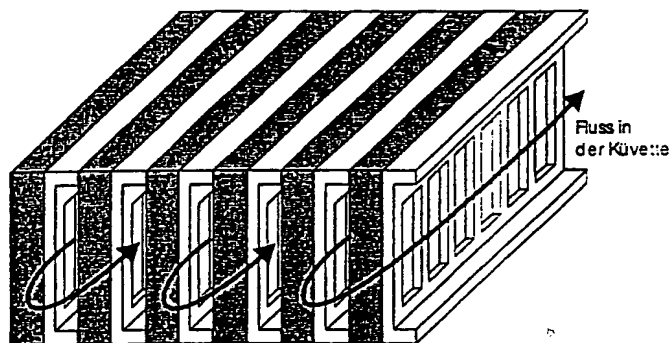


Fig. 5b

Figur 5



6/8

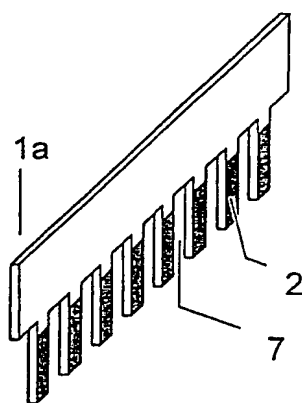


Fig. 6a

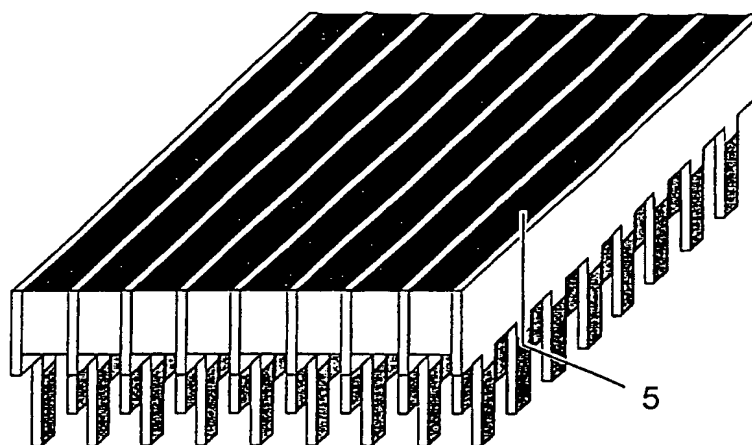
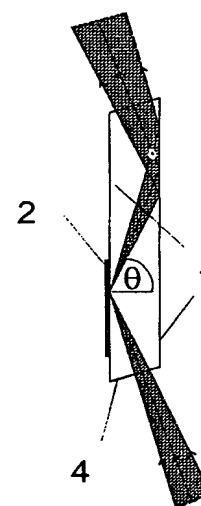
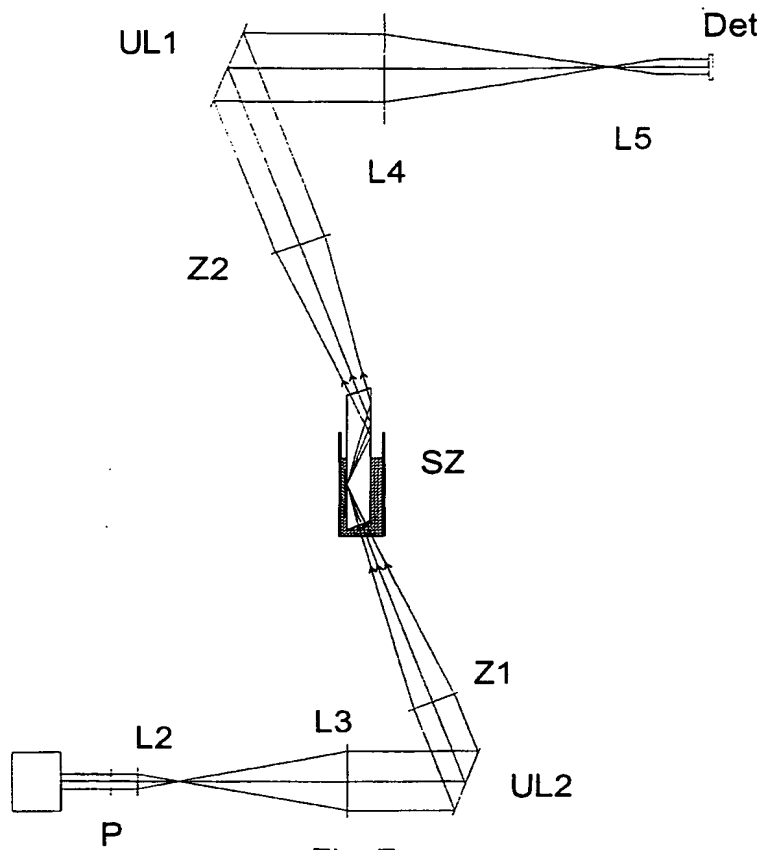


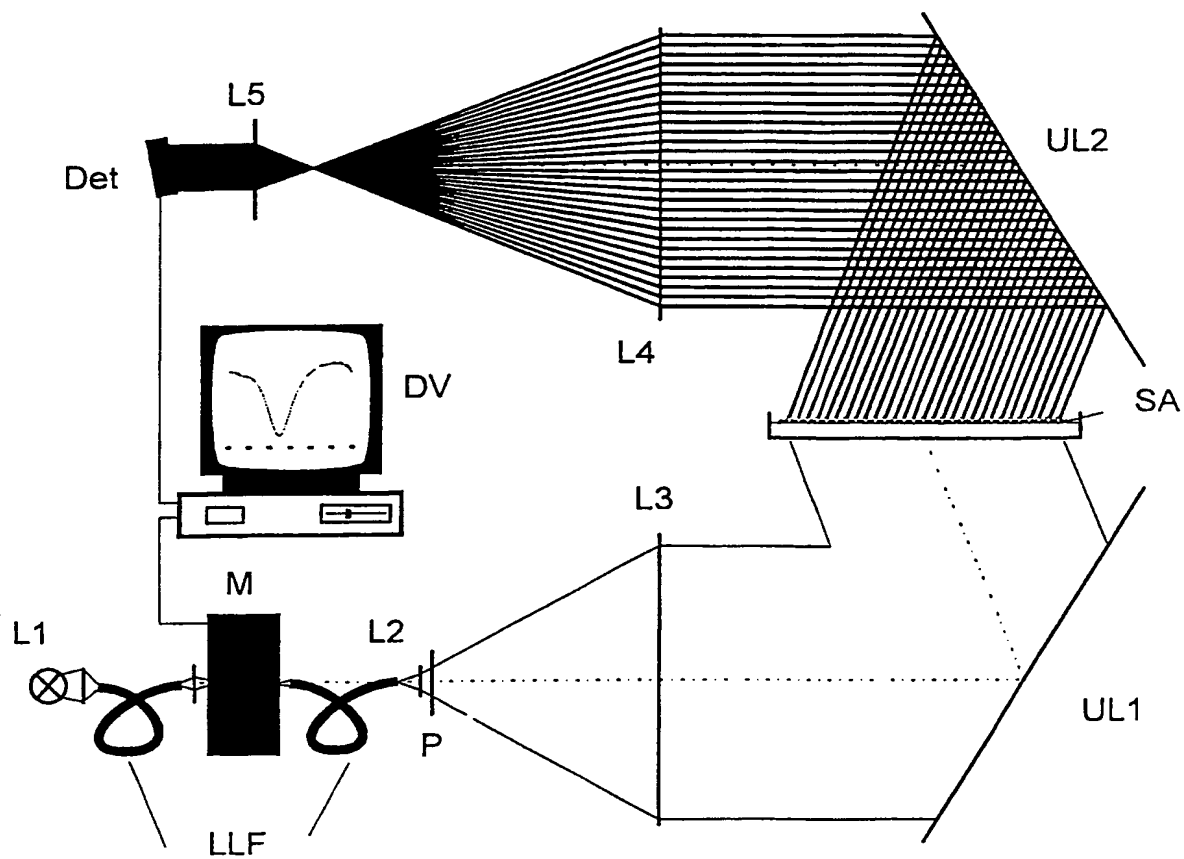
Fig. 6b

Figur 6



Figur 7

8/8



Figur 8

PCT/EP 01/01793

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 917 607 A (NAYA MASAYUKI) 29 June 1999 (1999-06-29) column 4-7; figures 1,3,4 ---	1-52
X	WO 95 22754 A (VALTION TEKNILLINEN ;LEKKALA JUKKA (FI); SADOWSKI JANUSZ (FI); JOK) 24 August 1995 (1995-08-24) page 5-7; claim 1; figures 3,4 ---	1-52
A	EP 0 971 226 A (SUZUKI MOTOR CO) 12 January 2000 (2000-01-12) figures 10,11,24,40,48,52-55,62,83,85 ---	1-52
A	WO 97 15819 A (UNIV WASHINGTON) 1 May 1997 (1997-05-01) page 33-36; figures 14A-14B ---	1-52
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2001

Date of mailing of the international search report

11/07/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mason, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01793

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 60382 A (VETTER DIRK ;BRAEUER ANDREAS (DE); DANZ NORBERT (DE); WALDHAEUSL R) 25 November 1999 (1999-11-25) figures 1-3 ----	1-52
A	WO 99 30135 A (PERKIN ELMER CORP ;TRACY DAVID H (US); WANG YONGDONG (US); BAHATT) 17 June 1999 (1999-06-17) page 40-41; figure 7 ----	1-52
A	US 5 313 264 A (SJOELANDER STEFAN ET AL) 17 May 1994 (1994-05-17) figures 1,3,4 ----	1-52
A	US 5 858 799 A (JUNG CHUCK C ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) figure 3 ----	1-52
A	US 5 792 667 A (FLORIN ERNST-LUDWIG ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) column 2, line 20 - line 50 -----	1-52

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Appl. No.

PCT/EP 01/01793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5917607 A	29-06-1999	JP 9292332 A JP 9292333 A	11-11-1997 11-11-1997
WO 9522754 A	24-08-1995	FI 940737 A	17-08-1995
EP 0971226 A	12-01-2000	JP 2000019100 A JP 2000230929 A JP 2000321280 A JP 2000346845 A	21-01-2000 22-08-2000 24-11-2000 15-12-2000
WO 9715819 A	01-05-1997	AU 7475996 A AU 7598996 A WO 9715821 A US 5822073 A US 5991048 A US 5815278 A	15-05-1997 15-05-1997 01-05-1997 13-10-1998 23-11-1999 29-09-1998
WO 9960382 A	25-11-1999	AU 4266499 A DE 19923820 A EP 1080365 A	06-12-1999 20-01-2000 07-03-2001
WO 9930135 A	17-06-1999	AU 1725999 A EP 1038167 A	28-06-1999 27-09-2000
US 5313264 A	17-05-1994	SE 462408 B AT 181423 T AT 100197 T DE 68912343 D DE 68912343 T DE 68929019 D DE 68929019 T EP 0534941 A EP 0442921 A JP 4504765 T JP 3064313 B JP 4501462 T SE 8804075 A WO 9005295 A WO 9005317 A US 5164589 A	18-06-1990 15-07-1999 15-01-1994 24-02-1994 05-05-1994 22-07-1999 07-10-1999 07-04-1993 28-08-1991 20-08-1992 12-07-2000 12-03-1992 10-11-1988 17-05-1990 17-05-1990 17-11-1992
US 5858799 A	12-01-1999	AU 7526496 A WO 9715820 A	15-05-1997 01-05-1997
US 5792667 A	11-08-1998	DE 4244086 A DE 59306219 D WO 9415196 A EP 0676046 A	07-07-1994 22-05-1997 07-07-1994 11-10-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01793

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 G01N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 917 607 A (NAYA MASAYUKI) 29. Juni 1999 (1999-06-29) Spalte 4-7; Abbildungen 1,3,4	1-52
X	WO 95 22754 A (VALTION TEKNILLINEN ;LEKKALA JUKKA (FI); SADOWSKI JANUSZ (FI); JOK) 24. August 1995 (1995-08-24) Seite 5-7; Anspruch 1; Abbildungen 3,4	1-52
A	EP 0 971 226 A (SUZUKI MOTOR CO) 12. Januar 2000 (2000-01-12) Abbildungen 10,11,24,40,48,52-55,62,83,85	1-52
A	WO 97 15819 A (UNIV WASHINGTON) 1. Mai 1997 (1997-05-01) Seite 33-36; Abbildungen 14A-14B	1-52
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/07/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mason, W

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. des Aktenzeichen  
PCT/EP 01/01793

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 60382 A (VETTER DIRK ;BRAEUER ANDREAS (DE); DANZ NORBERT (DE); WALDHAEUSL R) 25. November 1999 (1999-11-25) Abbildungen 1-3 ----	1-52
A	WO 99 30135 A (PERKIN ELMER CORP ;TRACY DAVID H (US); WANG YONGDONG (US); BAHATT) 17. Juni 1999 (1999-06-17) Seite 40-41; Abbildung 7 ----	1-52
A	US 5 313 264 A (SJOELANDER STEFAN ET AL) 17. Mai 1994 (1994-05-17) Abbildungen 1,3,4 ----	1-52
A	US 5 858 799 A (JUNG CHUCK C ET AL) 12. Januar 1999 (1999-01-12) Abbildung 3 ----	1-52
A	US 5 792 667 A (FLORIN ERNST-LUDWIG ET AL) 11. August 1998 (1998-08-11) Spalte 2, Zeile 20 - Zeile 50 -----	1-52



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 01/01793

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5917607 A	29-06-1999	JP 9292332 A JP 9292333 A	11-11-1997 11-11-1997
WO 9522754 A	24-08-1995	FI 940737 A	17-08-1995
EP 0971226 A	12-01-2000	JP 2000019100 A JP 2000230929 A JP 2000321280 A JP 2000346845 A	21-01-2000 22-08-2000 24-11-2000 15-12-2000
WO 9715819 A	01-05-1997	AU 7475996 A AU 7598996 A WO 9715821 A US 5822073 A US 5991048 A US 5815278 A	15-05-1997 15-05-1997 01-05-1997 13-10-1998 23-11-1999 29-09-1998
WO 9960382 A	25-11-1999	AU 4266499 A DE 19923820 A EP 1080365 A	06-12-1999 20-01-2000 07-03-2001
WO 9930135 A	17-06-1999	AU 1725999 A EP 1038167 A	28-06-1999 27-09-2000
US 5313264 A	17-05-1994	SE 462408 B AT 181423 T AT 100197 T DE 68912343 D DE 68912343 T DE 68929019 D DE 68929019 T EP 0534941 A EP 0442921 A JP 4504765 T JP 3064313 B JP 4501462 T SE 8804075 A WO 9005295 A WO 9005317 A US 5164589 A	18-06-1990 15-07-1999 15-01-1994 24-02-1994 05-05-1994 22-07-1999 07-10-1999 07-04-1993 28-08-1991 20-08-1992 12-07-2000 12-03-1992 10-11-1988 17-05-1990 17-05-1990 17-11-1992
US 5858799 A	12-01-1999	AU 7526496 A WO 9715820 A	15-05-1997 01-05-1997
US 5792667 A	11-08-1998	DE 4244086 A DE 59306219 D WO 9415196 A EP 0676046 A	07-07-1994 22-05-1997 07-07-1994 11-10-1995